

Media Peternakan, Agustus 2011, hlm. 112-116
EISSN 2087-4634
Terakreditasi B SK Dikti No: 43/DIKTI/Kep/2008

Versi online:
<http://medpet.journal.ipb.ac.id/>
DOI: 10.5398/medpet.2011.34.2.112

Tingkat Fertilisasi dan Perkembangan Embrio Mencit yang Diberi Ekstrak Buah Merah

Fertilization Rate and Development of Mice Embryos Fed Red Fruit Extract

S. Said^{a,*}, O. P. Astirin^b, & S. Wahyuningsih^b

^aPusat Penelitian Bioteknologi LIPI

Jln. Raya Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Jawa Barat

^bJurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret

Jln. Ir. Sutami 36 A Kientingan, Surakarta 57126, Jawa Tengah

(Diterima 19-11-2010; disetujui 23-04-2011)

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan menguji pengaruh ekstrak buah merah (EBM) terhadap tingkat pembuahan dan perkembangan embrio tikus tahap preimplantasi. Pemberian EBM dosis 0; 0,05; dan 0,1 ml/ekor/hari selama 7 hari untuk melihat pengaruh tingkat pembuahan, kemudian pemberian EBM dilanjutkan selama 0-3 hari masa kebuntingan (hari ke-0 kebuntingan ditandai dengan adanya sumbat vagina). Superovulasi pada mencit dilakukan dengan menyuntikkan 5 IU PMSG dan hCG (48 jam setelah penyuntikan PMSG), diikuti dengan mengawinkan mencit betina dengan jantan dengan perbandingan 1:1. Embrio tahap 1-sel dikoleksi 20 jam setelah penyuntikan hCG. Embrio selanjutnya difiksasi dan diwarnai untuk melihat terjadinya pembuahan normal (terbentuknya 2 pronukleus). Embrio tahap morula dan blastosis dikoleksi 84 jam setelah penyuntikan hCG. Pengaruh EBM pada dosis 0,1 ml terhadap pembuahan normal (terbentuknya 2 pronukleus), nyata lebih tinggi (46,01%) dibandingkan dengan dosis 0,05 ml (37,51%) dan kontrol (16,38%). Namun demikian, pengaruh EBM dengan dosis 0,05 ml dan 0,1 ml dapat menghambat perkembangan embrio mencit selama tahap preimplantasi *in vivo*.

Kata kunci: ekstrak buah merah (EBM), pembuahan, perkembangan embrio, mencit

ABSTRACT

In the present study examined the influence of red fruit extract (RFE) on fertilization rate and development of mice embryos during the pre-implantation stage. The application of RFE dose 0 ml/head/day, 0.05 ml/head/day, and 0.1 ml/head/day for seven days were conducted to examine its influence at the level of fertilization, then the application of RFE was continued during 0-3 days stage of pregnancy (0 day of pregnancy is the formation of the *vaginal plug*). The super-ovulation of the white mice was done by injecting of 5 IU PMSG and hCG (48 hours after PMSG), followed by mating the females with males with ratio 1:1. The single-cell-embryos were collected 20 hours after the injection of hCG. The eggs were then fixed and stained before examining the normal fertilization of eggs (formation 2 pronucleus). The morula and blastocysts were collected 84 hours after injection of hCG. The influence of the RFE with dose 0.1 ml on normal fertilization rate (formation 2 PN), significantly higher (46.01%) compared with dose 0.05 ml (37.51%) and controlled (16.38%). However, the influence of RFE with dose of 0.05 ml and 0.1 ml on the growth of pre-implantation stage embryos may inhibit the growth of mice embryos during the pre-implantation stage *in vivo*.

Key words: red fruit extract (RFE), fertilization eggs, embryos development, mice

PENDAHULUAN

Bioteknologi saat ini telah mengalami perkembangan yang pesat dan memberikan manfaat untuk

mengatasi masalah dalam sebagian aspek kehidupan. Salah satunya adalah bioteknologi embrio, pemanfaatan aplikasi bioteknologi *stem cells* yang digunakan sebagai terapi medis dengan menggunakan *inner cell mass* yang diisolasi dari blastosis. Kendala yang mungkin terjadi adalah adanya radikal bebas yang terdapat pada lingkungan sekitar tubuh maternal ataupun yang terdapat pada sistem reproduksi maternal, salah satunya adalah

* Korespondensi:
Telp. 021-8754587; e-mail: faiqoh02@yahoo.com

terjadinya radikal peroksil pada membran sel, sehingga dapat mempengaruhi perkembangan embrio khususnya tahap preimplantasi.

Embrio tahap preimplantasi merupakan salah satu bahan yang digunakan untuk penelitian di bidang bioteknologi embrio (IVF/IVM= in vitro fertilization/maturation, transfer embrio, dan stem cells). Tahap preimplantasi embrio merupakan tahap perkembangan dasar sebelum tahap organogenesis, tahap ini merupakan tahap yang sangat tergantung pada nutrisi yang ada pada cairan oviduk. Kelangsungan hidup embrio pada tahap selanjutnya sangat tergantung dari keberhasilan hidup embrio pada tahap preimplantasi.

Secara umum radikal bebas atau senyawa oksigen reaktif (reactive oxygen species= ROS) adalah atom atau gugus yang orbital luarnya memiliki elektron yang tidak berpasangan, bahan ini bersifat magnetik dan reaktif yang dapat menimbulkan kerusakan atau kematian sel dalam tubuh. Salah satu cara penangkal radikal bebas ini adalah dengan pemberian senyawa antioksidan. Antioksidan berperan aktif menangkap radikal peroksil dengan memberikan atom hidrogennya sehingga menjadi radikal baru yang bersifat lebih stabil karena terjadi delokalisasi elektron yang tidak berpasangan (Maslachah *et al.*, 2004). Senyawa antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas dan biasa dikonsumsi diantaranya adalah alfa tokoferol dan betakaroten (Maslachah *et al.*, 2004; Budi & Paimin, 2005). Contoh senyawa alami yang mengandung kedua antioksidan tersebut adalah ekstrak buah merah (EBM).

Menurut Budi & Paimin (2005), EBM mengandung senyawa antioksidan (alfa tokoferol dan betakaroten) yang tinggi, masing-masing 500 ppm dan 700 ppm. Beta karoten (vitamin A) dan alfa tokoferol (vitamin E) merupakan senyawa esensial yang dibutuhkan pada fungsi reproduksi (Lintig & Vogt, 2004; Jishage *et al.*, 2005). Penelitian yang dilakukan oleh Gajda *et al.* (2008) mengungkapkan bahwa efek suplementasi vitamin E terhadap kultur *in vitro* embrio babi dapat meningkatkan produksi blastosis. Fujii *et al.* (2005) menyatakan bahwa gamet sangat sensitif terhadap ROS. Antioksidan vitamin A, C, dan E serta glutathion (GSH) bereaksi dengan ROS dan mengkonversinya menjadi komponen yang tidak membahayakan.

Ekstrak buah merah dengan kandungan alfa tokoferol dan beta karoten yang berfungsi sebagai antioksidan dapat menangkal radikal bebas yang terdapat pada sistem reproduksi maternal, sehingga diharapkan dapat meningkatkan keberhasilan perkembangan embrio tahap preimplantasi. Masih terbatasnya informasi mengenai pengaruh EBM terhadap fungsi reproduksi khususnya pada perkembangan embrio, maka perlu diteliti untuk mempelajari pengaruh EBM terhadap tingkat fertilisasi dan perkembangan embrio tahap preimplantasi mencit (*Mus musculus*) *in vivo*.

MATERI DAN METODE

Ekstraksi Buah Merah

Ekstraksi buah merah mengikuti cara Budi & Paimin (2005). Secara singkat, buah merah matang di-

belah, dagingnya dipotong-potong lalu dicuci dengan air bersih. Daging buah dikukus selama 1-2 jam, setelah lunak diangkat dan didinginkan. Daging buah dihaluskan dengan tangan kemudian disaring untuk memisahkan dari bijinya. Hasil saringan dimasak kembali dengan api sedang (40 °C) selama 5-6 jam sambil diaduk, kemudian diangkat dan didiamkan selama 1 hari hingga terbentuk 3 lapisan, yaitu ampas (lapisan bawah), air (lapisan tengah), dan minyak (lapisan atas). Selanjutnya lapisan atas diambil dan dipisahkan.

Superovulasi

Mencit betina (bobot badan 30-35 g) disuperovulasi dengan suntikan 5 IU PMSG diikuti dengan suntikan 5 IU hCG secara *intraperitoneal*. Waktu penyuntikan PMSG (pregnant mare serum gonadotropin) adalah pertengahan siklus terang, yaitu pada pukul 12.00, sedangkan penyuntikan hCG (human chorionic gonadotropin) dilakukan 48 jam setelah PMSG. Selanjutnya dikawinkan dengan mencit jantan di dalam kandang terpisah dengan perbandingan jantan : betina= 1 : 1. Hari pertama kebuntingan ditandai dengan adanya sumbat vagina.

Koleksi Embrio Tahap 1-sel dan Morula-Blastosis

Embrio 1-sel dikoleksi 20 jam pasca penyuntikan hCG dengan menoreh bagian oviduk dalam medium CZB + Hepes + *Hyaluronidase*. Embrio tahap morula dan blastosis dikoleksi setelah 84 jam (3½ hari) pasca penyuntikan hCG dengan membilas bagian uterus menggunakan medium CZB + Hepes (Said *et al.*, 2003).

Fiksasi dan Pewarnaan

Embrio 1-sel yang telah dikoleksi diletakkan di atas kaca objek, lalu ditutup dengan kaca penutup yang memiliki bantalan terbuat dari parafin dan vaselin (1:9) dikeempat sudutnya. Difiksasi dengan glutaraldehid 2,5% dalam PBS pH 7,4 selanjutnya dicelup ke dalam formalin netral 10% selama 4 jam pada suhu ruangan. Sampel kemudian didehidrasi menggunakan etanol 95% dan diwarnai dengan *lacmoid* 0,25% dalam asam asetat 45%, kemudian dicuci dengan mengalirkan asetilgliserol pada sampel.

Pengamatan Perkembangan Embrio

Embrio 1-sel yang telah dikoleksi dicuci dengan medium CZB + Hepes. Selanjutnya embrio diletakkan pada gelas objek, difiksasi, diwarnai dan diamati pronukleusnya. Embrio tahap morula dan blastosis diamati dan dikelompokkan sesuai pada tahapannya (morula dan blastosis). Pengamatan pronukleus menggunakan *stereo microscope* dengan perbesaran 1000x, sedangkan untuk pengamatan morula dan blastosis menggunakan *inverted microscope* dengan perbesaran 1000x.

Rancangan Percobaan

Mencit betina yang digunakan sebanyak 30 ekor dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan, masing-masing

perlakuan sebanyak 10 ekor dibagi menjadi 2 subkelompok perlakuan, dan masing-masing subkelompok terdiri atas 5 ulangan. Pemberian EBM pada mencit betina dilakukan secara oral dengan dosis 0; 0,05; dan 0,1 ml/ekor/hari selama 7 hari berturut-turut sebelum fertilisasi (subkelompok pengamatan tingkat fertilisasi) dan selama 0-3 hari umur kebuntingan (subkelompok pengamatan tingkat perkembangan embrio preimplantasi *in vivo*).

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara kuantitatif menggunakan sidik ragam (analysis of variance), dilanjutkan dengan *Duncan's Multiple Range Test* menggunakan tingkat signifikansi 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mempelajari pengaruh pemberian EBM terhadap tingkat fertilisasi dan perkembangan embrio tahap preimplantasi mencit secara *in vivo*. Tingkat fertilisasi ditandai dengan terbentuknya 2 buah pronukleus jantan dan betina, sedangkan perkembangan embrio tahap preimplantasi ditandai dengan perkembangan embrio mencapai tahap morula dan blastosis.

Tingkat Fertilisasi

Pemberian EBM pada mencit selama 7 hari memberikan pengaruh nyata terhadap terjadinya fertilisasi normal yang ditandai dengan pembentukan 2 buah pronukleus (PN) jantan dan betina (Gambar 1). Pemberian EBM dosis 0,1 ml ($46,01 \pm 5,28$) berbeda secara signifikan terhadap kontrol ($16,38 \pm 3,25$) dan terhadap pemberian EBM dosis 0,05 ml ($37,51 \pm 1,57$) (Tabel 1). Perbedaan yang signifikan pada pemberian ekstrak buah merah (EBM) dosis 0,05 ml dan 0,1 ml terhadap tingkat fertilisasi karena terciptanya lingkungan yang mendukung proses kapasitas spermatozoa dalam sistem reproduksi betina, sehingga dapat mempermudah proses pembuahan. Menurut Meles (2006), terjadinya perubahan kemampuan spermatozoa yang ada di dalam saluran reproduksi betina untuk membuahi sel telur, disebabkan adanya perubahan lingkungan di dalam saluran reproduksi betina yang berperan dalam proses fertilisasi sehingga kapasitas dan fertilisasi dapat berlangsung.

Ekstrak buah merah (EBM) yang mengandung alfa tokoferol, beta karoten, dan asam lemak yang diberikan pada mencit betina selama tujuh hari sebelum fertilisasi yang berfungsi sebagai antioksidan, memberikan pengaruh terhadap lingkungan sistem reproduksi betina, dan mengurangi pengaruh *reactive oxygen species* (ROS) yang dihasilkan spermatozoa abnormal yang berada pada semen (Agarwal & Saleh, 2002; Maslachah *et al.*, 2004), akibat gangguan pada spermatogenesis (Agarwal & Saleh, 2002). Terciptanya lingkungan sistem reproduksi betina yang mengurangi reaksi oksidan pada spermatozoa sendiri oleh senyawa antioksidan dapat mendukung proses kapasitas spermatozoa dan meneruskan reaksi akrosomal sehingga pronukleus jantan dapat terbentuk.

Alfa tokoferol yang terkandung dalam EBM dapat bertindak sebagai antioksidan yang akan menetralkan ROS menjadi inaktif atau stabil. Menurut Agarwal & Saleh (2002), ROS yang terdapat pada semen harus inaktif atau kecil kadarnya. Kadar yang kecil diperlukan untuk mengatur fungsi normal sperma, seperti kapasitas sperma dan reaksi akrosomal. Hal ini didukung oleh hasil penelitian Maslachah *et al.* (2004), pemberian alfa tokoferol 100 mg/kg bb pada tikus yang diberi *stressor* berenang 30 menit/hari selama 21 hari, ternyata dapat mencegah penurunan jumlah spermatozoa normal.

Keberhasilan terbentuknya pronukleus jantan tergantung kepada ketersediaan kadar GSH (glutathione stimulating hormone) pada ovum untuk mereduksi ikatan disulfida (-S-S-) pada inti protamin spermatozoa menjadi ikatan -S-H- (*thiol*). Jika kadar GSH pada ovum cukup, maka dengan tereduksinya ikatan disulfida status kondensasi pada spermatozoa dapat berlanjut menjadi dekondensasi yang merupakan syarat keberhasilan terbentuknya pronukleus jantan. *Glutathione* pada oosit memiliki peran penting pada maturasi oosit (Luberda, 2005), selain itu GSH pada oosit juga berperan sebagai antioksidan dan melindunginya dari aktivitas toksik yang dihasilkan ROS, yaitu dengan memutus reaksi berantai, sehingga dapat meredam radikal berbahaya yang terbentuk selama reaksi berantai (Luberda, 2005).

Perkembangan Embrio Tahap Preimplantasi

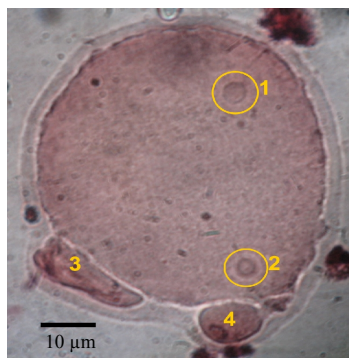
Perkembangan morula (Gambar 2a) pada pemberian EBM selama 7 hari sebelum fertilisasi dan dilanjutkan selama 0-3 hari umur kebuntingan pada dosis 0,05 ml ($15,88 \pm 3,37$) dan dosis 0,1 ml ($28,47 \pm 2,46$) nyata lebih tinggi ($P \leq 0,05$) dibandingkan dengan kontrol ($6,63 \pm 1,28$) (Tabel 2). Namun demikian, perkembangan lebih lanjut sampai dengan tahap blastosis (Gambar 2b), pemberian EBM sampai dengan dosis 0,1 ml ($71,53 \pm 2,46$) nyata lebih rendah ($P \leq 0,05$) dibandingkan dengan kontrol ($93,36 \pm 1,28$) dan dosis 0,05 ml ($84,12 \pm 3,37$).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian EBM mengakibatkan keterlambatan embrio berkembang sampai tahap blastosis. Penurunan kemampuan perkembangan embrio mamalia disebabkan disfungsi mitokondria dan ATP yang tersedia rendah (Neganova *et al.*, 2000). Menurut Silva (2006), selama perkembangan embrio, metabolisme dalam sel membentuk ROS pada sekitar ekstraselulernya. Efek dari ROS pada

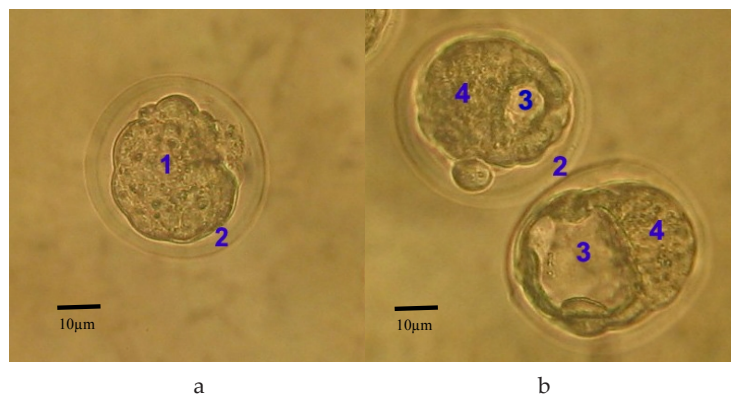
Tabel 1. Jumlah sel telur dan persentase pronukleus pada mencit yang diberi ekstrak buah merah (EBM) setelah 20 jam pasca hCG

Perlakuan	Jumlah sel telur	Persentase pronukleus (PN)	
		2 PN	1 PN
EBM 0 ml	98	$16,38 \pm 3,25^a$	$83,62 \pm 3,26^a$
EBM 0,05 ml	75	$37,51 \pm 1,57^b$	$62,49 \pm 1,57^b$
EBM 0,1 ml	67	$46,01 \pm 5,28^c$	$50,91 \pm 4,13^c$

Keterangan: superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$).



Gambar 1. Sel telur dengan dua buah pronukleus jantan dan betina. Keterangan: 1, 2: pronukleus; 3: polar bodi I; 4: polar bodi II.



Gambar 2. Embrio mencit tahap morula (a) dan blastosis (b). Keterangan: 1: sel *blastomer*; 2: *zona pelucida*; 3: *blastocoel*; 4: *inner cell mass*.

Tabel 2. Jumlah embrio dan persentase morula dan blastosis pada mencit yang diberi ekstrak buah merah (EBM)

Perlakuan	Jumlah embrio	Persentase morula dan blastosis	
		Morula	Blastosis
EBM 0 ml	105	6,63±1,28 ^a	93,36±1,28 ^a
EBM 0,05 ml	105	15,88±3,37 ^b	84,12±3,37 ^b
EBM 0,1 ml	105	28,47±2,46 ^c	71,53±2,46 ^c

Keterangan: superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$).

perkembangan embrio dapat memblok atau menahan perkembangan normal pada embrio. Semakin banyak sel hasil perkembangan embrio tersebut, maka semakin banyak pula ROS yang terbentuk.

Setelah fertilisasi pada awal perkembangan embrio, embrio masih tergantung dengan ekspresi gen dari maternalnya, sehingga masih dapat menangkal ROS atas bantuan GSH dari maternalnya. Genom embrio pada sapi diaktifkan pada tahap 8-16 sel, tanpa disertai sintesis GSH dari tubuh maternalnya (Silva, 2006). Genom embrio pada mencit, diaktifkan pada tahap 2-sel (Neganova, 2000). Tidak adanya ekspresi gen dari maternal pada embrio untuk menangkal ROS, maka embrio membutuhkan peningkatan ATP untuk perkembangannya. Stres oksidatif berimplikasi terhadap berbagai kerusakan sel termasuk lapisan peroksidasi lemak, oksidasi asam amino, apoptosis dan nekrosis yang akan menurunkan keberhasilan produksi embrio *in vitro* (Ali *et al.*, 2003; Kitagawa *et al.*, 2004).

Penurunan kemampuan perkembangan embrio sampai tahap blastosis pada penelitian ini, kemungkinan juga disebabkan oleh pemberian EBM dalam waktu yang cukup lama (7 hari sebelum fertilisasi dan dilanjutkan 3 hari setelah fertilisasi) yang mengakibatkan kerusakan organ uterus. EBM dapat menyebabkan degenerasi dan kongesti pada organ uterus. Kongesti merupakan suatu keadaan yang diakibatkan oleh terganggunya aliran darah, sehingga sirkulasi darah menjadi lambat dan oksi-

genasi ke jaringan menurun karena darah masih berada dalam pembuluh darah. Kejadian ini dapat mengurangi suplai oksigen dalam cairan uterus, sedangkan embrio preimplantasi sangat bergantung pada sekresi kelenjar oviduk dan uterus. Perkembangan embrio merupakan aktivitas dalam kondisi aerobik, yaitu aktivitas yang memerlukan oksigen (Campbell, 2004). Perkembangan embrio akan terhambat dengan berkurangnya suplai oksigen akibat kongesti pada uterus.

Hal lain yang dapat menurunkan kemampuan sel telur berkembang sampai tahap blastosis secara *in vivo* pada mencit karena EBM juga berfungsi sebagai antikan-ker atau menghambat perkembangan sel. Selanjutnya bahwa zat antikan-ker dapat mengganggu aktivitas mikrotubula. Gangguan pada gelendong mikrotubula dapat mengganggu aktivitas sel yang sedang membelah. Ekstrak buah merah yang telah terbukti memiliki aktivitas sebagai antikan-ker dan antitumor, juga dapat mengganggu terbentuknya gelendong mikrotubula yang kemungkinan berperan terhadap penurunan kemampuan sel telur berkembang sampai tahap blastosis.

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak buah merah meningkatkan fertilisasi sel telur mencit, namun memperlambat kemampuan embrio berkembang sampai tahap blastosis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada rekan-rekan kelompok penelitian hewan Puslit Bioteknologi – LIPI dan pihak-pihak yang telah membantu sehingga penelitian dan penulisan naskah ini dapat terlaksana dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, A. A., J. F. Bilodeau, & M. A. Sirard. 2003. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. *Theriogenology* 59:939–49.
- Agarwal, A. & R. A. Saleh. 2002. Review article: Role of oxidants in male infertility: Rationale, Significance, and Treatment. *Urologic Clinics of North America* 29: 1-11.

- Budi, I. M. & F. R. Paimin.** 2005. Buah Merah. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Campbell, A. Neil, J. B. Reece, & L. G. Mitchell.** 2004. Biologi. Edisi kelima. Jilid III. Terjemahan: W. Manalu. Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Fujii, J., Y. Iuchi, & F. Okada.** 2005. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3:43 (Abstr).
- Gajda, B., M. Bryla, & Z. Smorag.** 2008. Effect of protein source, vitamin E and phenazine ethosulfate on developmental competence and quality of porcine embryos cultured *in vitro*. *Folia Biologica (Krakow)* 56: 57-63.
- Hassa, H., F. Gurer., H. M. Tanir, M. Kaya, N. B. Gunduz, A. E. Sariboyaci, & C. Bal.** 2007. Effect of cigarette smoke and alpha-tocopherol (vitamin E) on fertilization, cleavage, and embryo development rates in mice: An experimental *in vitro* fertilization mice model study. *Eur. J. Obstet Gynecol Reprod Biol* 15: 1802 (Abstr).
- Jishage, K., T. Tachibe, T. Ito, N. Shibata, S. Suzuki, T. Mori, T. Hani, H. Arai, & H. Suzuki.** 2005. Vitamin E is essential for mouse placentation but not for embryonic development it self. *Biol. Reprod.* 73: 983-987.
- Kitagawaa, Y., K. Suzuki, A. Yoneda, & T. Watanabe.** 2004. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology* 62:1186-97.
- Lintig, J. & K. Vogt.** 2004. Vitamin A formation in animals: Molecular identification and fuctional characterization of carotene cleaving enymes. *J. Nutr.* 134: 251S-256S.
- Luberda, Z.** 2005. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod. Biol.* 5: 5-13
- Maslachah, L., M. Sukmanadi, & R. Sugihartuti.** 2004. Pengaruh pemberian antisterilitas alpha tocopherol terhadap spermatogenesis tikus yang menerima stresor. *J. Pen. Med. Eks.* 5: 258-269.
- Meles, D. K.** 2006. efek fraksi alkaloid achyranthes aspera L. terhadap fertilisasi dan pembelahan embrio tikus. *JBP* 8: 82-86.
- Neganova, I. E., G. G., Sekirina, & U. E. Ritter.** 2000. Surface-expressed E-cadherin, and mitochondrial and microtubule distribution in rescue of mouse embryos from 2-cell block by aggregation. *Mol. Hum. Reprod.* 6: 454-46.
- Said, S. M. S. Han, & K. Niwa.** 2003. Development of rat oocytes following intracytoplasmic injection of sperm heads isolated from testicular and epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 60: 359-369.
- Silva, P. F. N.** 2006. Physiologi of peroxidation processes in mammalian sperm: Chapter I. Oxidative stress and fertility-aspects of molecular oxidation and their effects on the mammalian reproductive output. Thesis PhD. Faculty of Veterinary Medicine. Utrecht Universty, Portuguese.